(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)**公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号

特開平5－287209

(43)公開日　平成５年(1993)11月２日

(51)Int.Cl.[5]	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
Ｃ０９Ｂ　23/00		Ｋ　7375－4Ｈ		
		Ｍ　7375－4Ｈ		
Ｃ０９Ｋ　11/06		Ｚ　6917－4Ｈ		
Ｇ０１Ｎ　21/64		Ｚ　9115－2Ｊ		
21/78		Ｃ　7906－2Ｊ		

審査請求　未請求　請求項の数６(全　８　頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平4－88743

(22)出願日　平成４年(1992)４月９日

(71)出願人　000004455
日立化成工業株式会社
東京都新宿区西新宿２丁１番１号

(72)発明者　片寄　光雄
茨城県日立市東町４丁目13番１号　日立化成工業株式会社茨城研究所内

(72)発明者　田井　誠司
茨城県日立市東町４丁目13番１号　日立化成工業株式会社茨城研究所内

(72)発明者　渡辺　博夫
茨城県日立市東町４丁目13番１号　日立化成工業株式会社茨城研究所内

(74)代理人　弁理士　若林　邦彦

(54)【発明の名称】　蛍光標識用色素、蛍光標識用色素で標識された生物由来物質、及びそれらを含有する試薬

(57)【要約】

【目的】６７０～７８０ｎｍ付近に発振波長をもつ小型半導体レーザを用いて測定するための、種々の抗原・薬物の分析やＤＮＡの塩基配列の分析等に有用な試薬を提供する。

【構成】一般式（Ｉ）で表される蛍光標識用色素、それによって標識されたビタミン、ヌクレオチドもしくはタンパク質等の生物由来物質、又はこれらを含有する試薬。

【化１】（一般式（Ｉ）中、A^1及びA^2はそれぞれ独立にベンゼン環、ナフタレン環等であり、R^1～R^3はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基等であり、X^1は硫黄原子、酸素原子等であり、X^2は硫黄原子、酸素原子、Ｃ＝Ｏ等であり、Ｌはポリメチレン基である。）

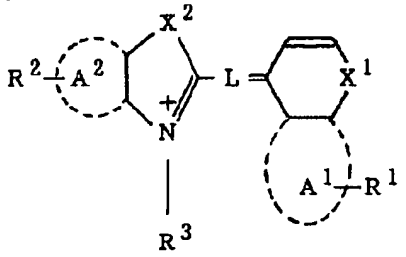
6/7/06, EAST Version: 2.0.3.0

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式（Ｉ）

【化1】



〔Ｉ〕

〔一般式（Ｉ）中、

A^1及びA^2は、それぞれ独立に、炭素原子及び水素原子から成る芳香環、又は炭素原子及び水素原子のほかに窒素原子及び／又は酸素原子及び／又は硫黄原子から成る芳香環を示し、

R^1、R^2及びR^3は、それぞれ独立に、アルキル基、複素環残基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アリール基、アラルキル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基、アルキルアミド基、アルキルスルフォンアミド基、アルコキシカルボニル基、アリーロキシカルボニル基、アリールカルボニルオキシ基、アリールアミド基、アルキルアミノ基、アルキルカルバモイル基、アルキルスルファモイル基、アリールカルバモイル基、アリールアミノ基、アリールスルフォニル基、アリールスルフォンアミド基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、アリールスルファモイル基、シアノ基、ニトロ基、スルフォン酸、スルフォン酸塩、カルボン酸塩、これらを置換基にもつアルキル基、又は水素原子を示し、

X^1は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、NR^4（ただし、R^4はR^1～R^3と同じ意味）を示し、

X^2は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、Ｃ＝Ｏ、ＣＨ＝ＣＨ、NR^5又はCR^6R^7（ただし、R^5、R^6及びR^7はR^1～R^3と同じ意味）を示し、

Ｌは、ポリメチレン基を示す。〕で表される蛍光標識用色素。

【請求項2】請求項1記載の蛍光標識用色素を含有する試薬。

【請求項3】請求項1記載の蛍光標識用色素で標識された生物由来物質。

【請求項4】請求項3の生物由来物質を含有する試薬。

【請求項5】生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである請求項3記載の生物由来物質。

【請求項6】生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである請求項4記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、蛍光標識用色素、蛍光

2

標識用色素で標識された生物由来物質、及びそれらを含有する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】フタロシアニン類は種々の免疫分析に使用できることが種々報告されている（ＵＳ特許第4,160,645号公報、ＵＳ特許第4,193,983号公報、ＵＳ特許第4,220,450号公報、ＵＳ特許第4,233,402号公報、ＵＳ特許第4,235,869号公報、ＵＳ特許第4,256,834号公報、ＵＳ特許第4,277,437号公報、ＵＳ特許第4,318,707号公報、ＵＳ特許第4,483,929号公報、ＵＳ特許第4,540,660号公報、ＵＳ特許第4,540,670号公報、ＵＳ特許第4,560,534号公報、ＵＳ特許第4,650,770号公報、ＵＳ特許第4,656,129号公報、ＵＳ特許第4,659,676号公報）。

【0003】更に、フタロシアニン類は、化学発光免疫分析系で触媒として使用されている〔Ｂｕｌｌ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｊｐｎ．第56巻、2965－2968頁（1983）、同第56巻、2267－2271頁（1983）、同第57巻、587－588頁（1984）、同第57巻、3009－3010頁（1984）、同第58巻、1299－1303頁（1985）〕。原らは、ルミノールと過酸化水素とのあいだの化学発光反応の触媒として鉄フタロシアニンを用いて、化学発光のシグナル量から、テストサンプル中の分析対象を定量している。彼らは鉄及びコバルトのフタロシアニン並びに鉄、パラジウム、白金、マンガン及びスズのポルフィリン錯体について検討し、鉄フタロシアニンが最も優れた触媒作用を示し、かつ高感度であることを報告した。

【0004】免疫分析で着色物質のほかに蛍光物質が広く利用されているが、さらに、酵素免疫分析においても、蛍光物質は感度を上げることができるので着色物質よりも好んで使用されるようになってきている。よく知られた蛍光物質－酵素対はアルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase）と４－メチルウムベリフェリルホスフェート（4-methylumbelliferyl phosphate）、β－ガラクトシダーゼ（β－galactosidase）と４－メチルウムベリフェリル－Ｄ－ガラクトピラノシド（4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside）、西洋ワサビのパーオキシダーゼ（horse radish peroxidase）とｐ－ヒドロキシフェニル酢酸（p-hydroxyphenyl acetic acid）等があり、これらの系の検出感度は10^{-15} Ｍである。しかし検出感度をさらに上げようとしても生成する蛍光体の分析特性には限界がある。

【0005】最近、蛍光量子収率が高く、水に対して高い溶解性を示すフタロシアニン類を用いた試薬が提案された（ＷＯ特許第88／04777号公報、ＷＯ特許第90／02747号公報、特開平1－233222号公報）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、フタロシアニン類は、そのQ－バンドの吸収域及び蛍光発光域が655～700nmの領域にあって、生体内物質として存在する血液中のヘム等の吸収域（＜700nm）と重なっているため、その妨害を受ける欠陥がある。

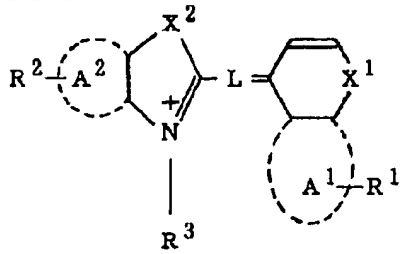
【0007】また、放射線光源は今後安価で小型の半導体レーザ（670～780nm）が主流になると考えられるが、670～690nmの半導体レーザで励起する場合に、フタロシアニン類は蛍光発光領域がこれと同様の波長域にあるため、照射レーザ光からの散乱光と蛍光発光を区別することが困難であるだけでなく、700～780nmの半導体レーザで励起する場合には、フタロシアニン類は光を吸収できないため励起されず、したがって検出薬としての役目を果たさない。更に、フタロシアニン類は大きなπ共役系を有するために会合しやすい性質があり、会合体が生成すると蛍光量子収率が著しく低下する欠点がある。

【0008】本発明は、血液中に存在するヘム等の生体内物質に影響されず、また、将来主流になると予想される安価で小型の半導体レーザ（670～780nm）を用いて測定するための、血液中の種々の抗原、薬物の分析やあるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は下記（1）～（6）に関するものである。すなわち、（1）一般式（I）

【化2】



〔I〕

〔一般式（I）中、A^1及びA^2は、それぞれ独立に、炭素原子及び水素原子から成る芳香環、又は炭素原子及び水素原子のほかに窒素原子及び／又は酸素原子及び／又は硫黄原子から成る芳香環を示し、R^1、R^2及びR^3は、それぞれ独立に、アルキル基、複素環残基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アリール基、アラルキル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基、アルキルアミド基、アルキルスルフォンアミド基、アルコキシカルボニル基、アリーロキシカルボニル基、アリールカルボニルオキシ基、アリールアミド基、アルキルアミノ基、アルキルカルバモイル基、アルキルスルファモイル基、アリールカルバモイル基、アリールアミノ基、アリールスルフォニル基、アリールスルフォンアミド基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、アリールスルファモイル基、シアノ基、ニトロ基、スルフォン酸、スルフォン酸塩、カルボン酸塩、これらを置換基にもつアルキル基、又は水素原子を示し、X^1は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、NR^4（ただし、R^4はR^1～R^3と同じ意味）を示し、X^2は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、C＝O、CH＝CH、NR^5又はCR^6R^7（R^5、R^6及びR^7はR^1～R^3と同じ意味）を示し、Lは、ポリメチレン基を示す。〕で表される蛍光標識用色素。

（2）上記（1）の蛍光標識用色素を含有する試薬。

（3）上記（1）の蛍光標識用色素で標識された生物由来物質。

（4）上記（3）の生物由来物質を含有する試薬。

（5）生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである上記（3）の生物由来物質。

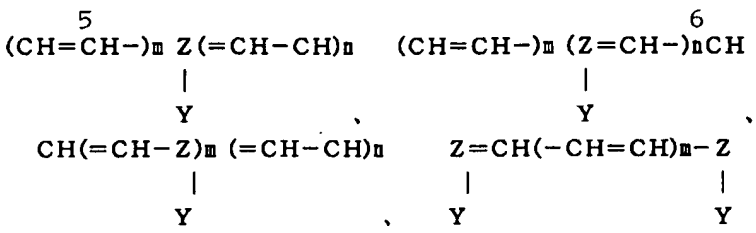
（6）生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである上記（4）の試薬。

【0010】本発明の一般式（I）で表される化合物において、A^1及びA^2の炭素原子及び水素原子から成る芳香環の具体例としては、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、フェナントレン等があり、炭素原子及び水素原子のほかに窒素原子及び／又は酸素原子及び／又は硫黄原子から成る芳香環の具体例としては、ピリジン、1，2－ジアジン、1，3－ジアジン、1，4－ジアジン、キノリン、イソキノリン、キノキサリン、1，3－ベンゾジアジン、2，3－ベンゾジアジン、1，8－ジアザナフタレン、1，5－ジアザナフタレン、1，7－ジアザナフタレン、1，6－ジアザナフタレン、ピロール、イミダゾール、チオフェン、フラン等がある。これらの芳香環は任意の可能な位置で縮環できる。

【0011】本発明の一般式（I）で表される化合物において、R^1～R^3、並びにX^1及びX^2中のR^4～R^7のアルキル基又はアルキル基を含む基のアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、sec－プロピル基、n－ブチル基、iso－ブチル基、t－ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等があり、アリール基又はアリール基を含む基のアリール基の具体例としては、フェニル基、ナフチル基、アントラニル基、フェナントレニル基等があり、複素環残基の具体例としてはピリジル基、ピリダジル基、ピリミジル基、ピラジル基、キノリル基、イソキノリル基、キノキサリル基、ベンゾピリミジル基、ベンゾピリダジル基、ジアザナフチル基、ピロリル基、イミダジル基、チエニル基、フリル基等がある。

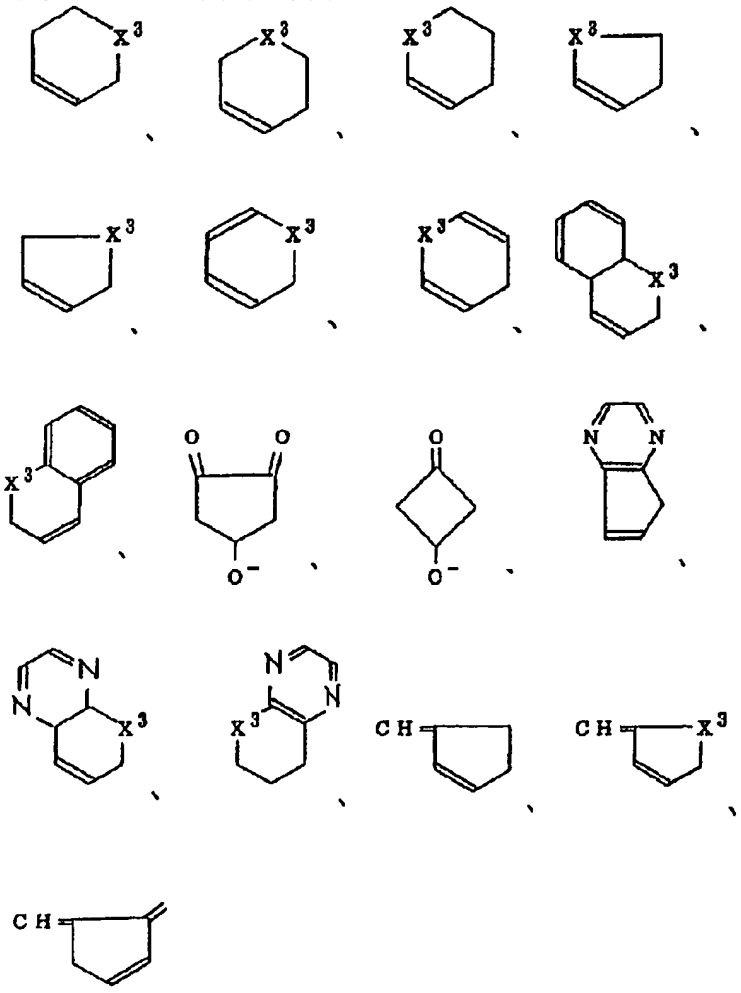
【0012】Lで表されるポリメチレン基としては、次の化3で表される基等がある。

【化3】



【００１３】化３中、ｍ及びｎは０～５の整数であり、Ｙは水素原子、メチル基等の低級アルキル基、メトキシ基等の低級アルコキシ基、ジメチルアミノ基、ジフェニルアミノ基、メチルフェニルアミノ基、モルフォリノ基、イミダゾリジン基及びエトキシカルボニルピペラジン基等のジ置換アミノ基、アセトキシ基等のアルキルカルボニルオキシ基、メチルチオ基等のアルキルチオ基、シアノ基、ニトロ基、又はハロゲン原子等であり、また、Ｚは二重結合を共役させるための基で、具体的には、－ＣＨ－、シクロヘキサジエン、シクロペンタジエン、インデン、１，４－ジヒドロナフタレン、１，２－ジヒドロナフタレン、５，８－ジヒドロキノキサリン、５，６－ジヒドロキノキサリンのほか、化４に示す基などが挙げられる。

【化４】



ただし、化４中、X^3はＮ－R^8（ただし、R^8はアルキル基を示す）、硫黄原子又は酸素原子である。

【００１４】本発明において、一般式（Ｉ）で表される化合物は、例えば、「大有機化学、含窒素複素環化合物※Ｉ」４３２ページ（朝倉書店）等の参考書に記載された方法によって合成できる。一般式（Ｉ）で表される化合物の例を表１に示す。

【表１】

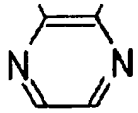
表１　一般式（Ｉ）で表される化合物の例

No.	A¹	X¹	R¹	L	A²	X²	R²	R³
1	化5	N-C_2H_5	-	化9	化5	$C(CH_3)_2$	-	$(CH_2)_3SO_3^-$
2	化5	N-C_2H_5	-	化9	化5	N-C_2H_5	-	$(CH_2)_3SO_3^-$
3	化5	N-C_2H_5	-	化9	化6	S	-	$(CH_2)_3SO_3^-$
4	化5	N-C_2H_5	-	化9	化6	C=O	-	$(CH_2)_3SO_3^-$
5	化5	O	CH_3	化10	化5	$C(CH_3)_2$	-	$(CH_2)_3SO_3^-$
6	化5	S	CH_3	化10	化12	$C(CH_3)_2$	SO_3Na	$(CH_2)_4SO_3^-$
7	化5	Se	CH_3	化10	化12	CH=CH	SO_3Na	$(CH_2)_4SO_3^-$
8	化6	N-CN	-	化9	化13	CH=CH	Cl	$(CH_2)_2COO^-$
9	化6	N-CH_3	-	化9	化5	C=O	-	$(CH_2)_2PO_3^-$
10	化7	化8	CH_3	化9	化7	$C(CH_3)_2$	-	$CH_3 \cdot I^-$
11	化7	化8	-	化11	化7	N-CH_3	-	$C_2H_5 \cdot Cl^-$

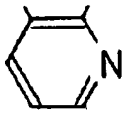
ただし、表１中、化５～化１３は下記の基を示す。

【化５】

【化６】



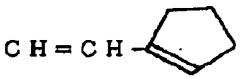
【化７】



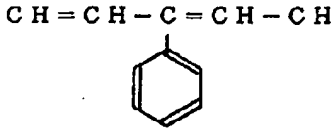
【化８】N－（CH_2）$_3$COOH

【化９】（CH＝CH）$_2$－CH

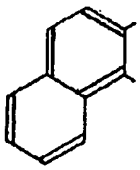
【化１０】



【化１１】

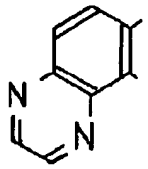


【化１２】



【化１３】

*



【００１５】本発明において用いられる生物由来物質としては、動物、植物、微生物（ウイルスを含む）等の生物から得られるタンパク質・ペプチド、ヌクレオチド、糖類、脂質、ホルモン、ビタミン、アルカロイド、抗生物質、それらの複合物等があり、これらは、天然から抽出したもの、人工的に完全合成したもの、あるい人工的に半合成したもののいずれであってもよい。

【００１６】タンパク質・ペプチドの具体例としては、血清アルブミン、ＩｇＧ・ＩｇＡ・ＩｇＭ・ＩｇＤ・ＩｇＥ等の免疫グロブリン、種々のタンパク質や白血球の膜抗原に対するモノクローナル抗体、パーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素等が挙げられ、ヌクレオチドの具体例としてはＤＮＡ、ＲＮＡ、合成オリゴヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰ、ＴＴＰ、ＵＴＰ、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＵＴＰ、ｄｄＡＴＰ、ｄｄＣＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＵＴＰ、あるいはそれらの誘導体等が挙げられ、糖類の具体例としては、グリコーゲン、デンプン、マンナン等の多糖類のほかオリゴ糖やグルコース、マンノース等の単糖類が挙げられ、脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノラミン、脂肪、脂肪酸等が挙げられ、ホルモンとしてはインシュリン、成長ホルモン、オキシトシン、バソプレッシン、セクレチン、上皮細胞成長因子、ガストリン、グルカゴン、カルシトニン等のペプチド性ホルモン、アンドロゲン、エストロゲン、ハイドロコーチゾン等のステロイドホルモン、アドレナリン、ノルアドレナリン等のカテコラミン類等が挙げられ、ビタミンとしてはビタミンＡ、ビタミ

ンB1、B2、B6、B12、p－アミノ安息香酸（以下、PABAという）、ビオチン、葉酸、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等の各種ビタミンが挙げられ、アルカロイドとしてはモルフィン等のアヘンアルカロイド、アトロピン、スコポラミン等のトロパンアルカロイド、ビンブラスチン、ビンクリスチン等のインドールアルカロイド、オウレン等のイソキノリンアルカロイド等が挙げられ、抗生物質としては、ペニシリン、セファロスポリン、カナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール等が挙げられる。

【００１７】生物由来物質に蛍光標識用色素を結合させるためには、生物由来物質中のアミノ基、水酸基等の官能基と蛍光標識用色素中のカルボキシル基、スルフォン基等の官能基を利用して直接、イオン結合的又は共有結合的に直接結合させるか、あるいは蛍光標識用色素が反応できるように、生物由来物質の一部に結合基（リンカー）を付加する等の化学修飾を施したのち、反応させればよい。蛍光標識用色素で標識された生物由来物質はクロマトグラフィー、再結晶等の慣用の分離手段により精製することができる。

＊【００１８】一般式（Ｉ）で表される化合物は、芳香環やポリメチレン基を種々変えることにより、長波長域（７００ｎｍ以上）の任意の波長域に吸収又は蛍光極大を移動させ、生体中の種々のスペクトル的妨害因子の影響を除くことができるので、血液中の種々の抗原、薬物の分析やあるいはＤＮＡの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬として利用できる。

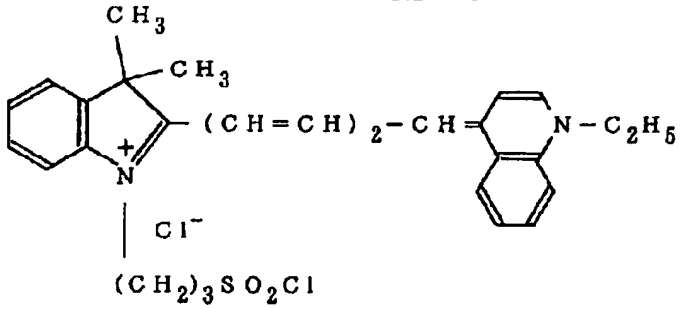
【００１９】

【実施例】以下、実施例により更に具体的に本発明を説明する。ただし、化合物Ｎｏ．は表１に示した化合物Ｎｏ．に対応する。

実施例１　化合物Ｎｏ．１のＰＡＢＡ付加体の合成

文献（大有機化学、含窒素複素環化合物Ｉ、４３２ページ（朝倉書店））に記載の方法を参考にして、化合物Ｎｏ．１を合成した。得られた化合物Ｎｏ．１を２５０ｍｇとり、クロロホルムに溶かし、２５℃でオギザリルクロリド２．０ｍｌを滴下し、室温で６時間撹拌したのち、溶媒を除去し、化合物Ｎｏ．１の固体状スルホニルクロライド誘導体(化１４)を得た。

＊【化１４】



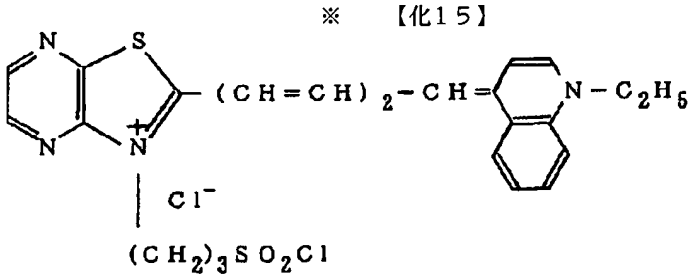
更に、水１．５ｍｌに炭酸ナトリウム８６ｍｇ及びｐ－アミノ安息香酸（ＰＡＢＡ）５０ｍｇを加え、８０℃に加熱して溶かした液に、上記の化１４のスルホニルクロライド誘導体５１ｍｇを加え、８０℃で６時間撹拌後、溶媒を除去し、得られた固体を、１０重量％NH_4OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物Ｎｏ．１のＰＡＢＡ付加体を得た。

【００２０】

※実施例２　化合物Ｎｏ．３のＰＡＢＡ付加体の合成

実施例１に記載した文献の方法を参考にして、化合物Ｎｏ．３を合成した。得られた化合物Ｎｏ．３を６０１ｍｇとり、クロロホルムに溶かし、２５℃でオギザリルクロリド２．３ｍｌを滴下し、室温で６時間撹拌したのち、溶媒を除去し、化合物Ｎｏ．３の固体状スルホニルクロライド誘導体(化１５)を得た。

※【化１５】



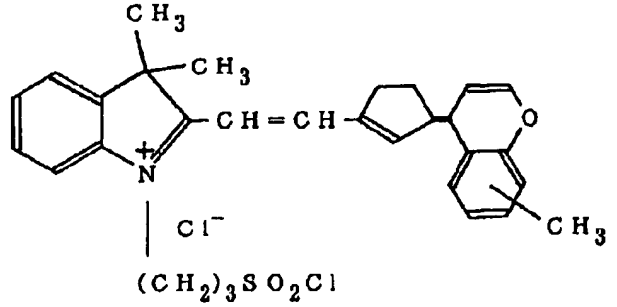
更に、水１．５ｍｌに炭酸ナトリウム７８ｍｇ及びｐ－アミノ安息香酸（ＰＡＢＡ）５０ｍｇを加え、８０℃に加熱して溶かした液に、上記の化１５のスルホニルクロライド誘導体５０ｍｇを加え、８０℃で６時間撹拌後、

★溶媒を除去し、得られた固体を、１０重量％NH_4OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物Ｎｏ．３のＰＡＢＡ付加体を得た。

【００２１】

実施例3　化合物No．5のPABA付加体の合成
実施例1に記載した文献の方法を参考にして、化合物No．5を合成した。得られた化合物No．5を510mgとり、クロロホルムに溶かし、25℃でオギザリルク＊ロリド1．5mlを滴下し、室温で6時間撹拌したのち、溶媒を除去し、化合物No．5のスルホニルクロライド誘導体（化16）を得た。

【化16】

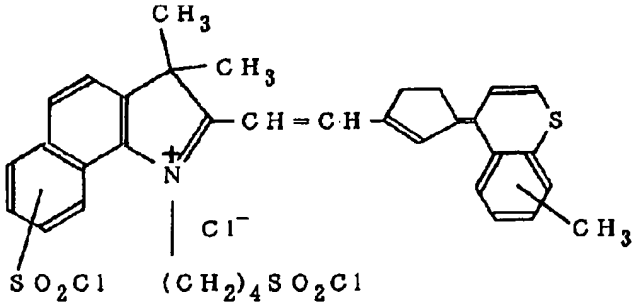


更に、水1．5mlに炭酸ナトリウム78mg及びp－アミノ安息香酸（PABA）50mgを加え、80℃に加熱して溶かした液に、上記の化16のスルホニルクロライド誘導体49mgを加え、80℃で6時間撹拌後、溶媒を除去し、得られた固体を、10重量%NH_4OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物No．5のPABA付加体を得た。

【0022】

※実施例4　化合物No．6のPABA付加体の合成
実施例1に記載した文献の方法を参考にして、化合物No．6を合成した。得られた化合物No．6を501mgとり、クロロホルムに溶かし、25℃でオギザリルクロリド1．5mlを滴下し、室温で6時間撹拌したのち、溶媒を除去し、化合物No．6のスルホニルクロライド誘導体（化17）を得た。

【化17】



更に、水1．5mlに炭酸ナトリウム78mg及びp－アミノ安息香酸（PABA）50mgを加え、80℃に加熱して溶かした液に、上記の化17のスルホニルクロライド誘導体50mgを加え、80℃で6時間撹拌後、溶媒を除去し、得られた固体を、10重量%NH_4OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物No．6のPABA付加体を得た。

【0023】実施例5　化合物No．1、No．3、No．5又はNo．6で標識されたモルフィンの合成
実施例1で得た化合物No．1のPABA付加体（100mg）のトリエチルアミン（1．5ml）溶液に、0℃でクロロギ酸エチル10mlを撹拌しながら加えた。5分間撹拌後、3－（4－アミノブチル）モルフィン40mgを加え、室温で8時間撹拌して、化合物No．1★★で標識されたモルフィンを得た。同様にして、化合物No．1のPABA付加体の代わりに、化合物No．3、No．5及びNo．6のPABA付加体を用いて反応を行い、それぞれ化合物No．3、No．5及びNo．6で標識されたモルフィンを得た。

【0024】実施例6　抗モルフィンモノクローナル抗体に対する親和性試験
モルフィン、アミノモルフィン及び化合物No．1、No．3、No．5もしくはNo．6で標識されたモルフィンについて、抗モルフィンモノクローナル抗体に対する親和性（モルフィンに対する親和性を1．0とし、相対値で表す）をトリチウムをラベルしたモルフィンとの競争反応により測定した。測定結果を表2に示す。

【表2】

表2　抗体に対する標識化モルフィンの相対親和性

化合物（抗原）	相対親和性

モルフィン	1．0
アミノモルフィン	1．0
化合物Ｎｏ．１標識化モルフィン	0．9
化合物Ｎｏ．３標識化モルフィン	1．0
化合物Ｎｏ．５標識化モルフィン	1．0
化合物Ｎｏ．６標識化モルフィン	1．0

【００２５】表２の結果から、化合物（抗原）による親和性の違いはほとんどみられず、式（Ｉ）で表される化合物でモルフィンを標識しても抗体との親和性はほとんど変わらないことが分かった。

【００２６】実施例７　化合物Ｎｏ．１で標識されたオリゴヌクレオチド・プライマーの合成とＤＮＡ塩基配列の分析への応用

（１）リンカーが結合したオリゴヌクレオチド・プライマーの合成

固相ＣＥＤ－フォスフォラミド法を用いた自動ＤＮＡ合成装置によりプライマー（５’－ＧＴＴＴＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣ－３’）を合成した。合成したプライマーのリン酸化は、５０ｍＭトリス－塩酸（ｐＨ７．６）、１０ｍＭ塩化マグネシウム、１０ｍＭジチオスレイトール、３ｍＭ ＡＴＰ、T_4－ヌクレオチドカイネースを含む１００μｌの反応液中で３７℃、１時間保温して行った。リン酸化されたプライマーは、ゲル沪過用カラムを使用して高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で分離し、リン酸化されたプライマーのピークを集め、凍結乾燥で溶媒を除いた。

【００２７】次に、これを２５０ｍＭの１，２－ジアミノエタン（ｐＨ６．０），２００ｍＭのエチル－３（３－ジエチルアミノプロピル）カルボジイミド及び１００ｍＭのＮ－メチルイミダゾール（ｐＨ６．０）を含む反応液１００μｌ中、２５℃で一晩保温して５’末端のグアノシンのリン酸部にリンカー〔$NH_2-(CH_2)_2-N*$－〕を結合させた。

【００２８】（２）化合物Ｎｏ．１で標識されたオリゴヌクレオチド・プライマーの合成

化合物Ｎｏ．１で標識されたモルフィンと上記（１）で合成した５’末端グアノシンのリン酸部にリンカーが結合したオリゴヌクレオチド・プライマーを、０．２Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．３）中で混合し、２５℃で一晩、暗所に保温したのち、ＨＰＬＣで精製することにより、リンカーを介して化合物Ｎｏ．１が結合したプライマーを得た。

【００２９】（３）ＤＮＡの塩基配列の分析

既知の塩基配列のＤＮＡをサンプルとし、リンカーを介して化合物Ｎｏ．１が結合したプライマーを用いて、それぞれ４種の塩基でサンガー反応を行ったのち、それぞれ別々のレーンで電気泳動分離し、７８０ｎｍの発振波長の半導体レーザーを搭載したＤＮＡシークエンサーで分析した。その結果、ＤＮＡの３００塩基までを９９％の精度で決定できた。

【００３０】

【発明の効果】本発明により、血液中に存在するヘム等の生体内物質に影響されず、また、将来主流になると予想されるに小型の半導体レーザ（６７０～７８０ｎｍ）を用いて測定するための、種々の抗原、薬物の分析やあるいはＤＮＡの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供できた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.^{5}	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
Ｇ０１Ｎ　33/533		8310－2Ｊ		